Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Article
Vol. 16, No.2, 2024, p. 287-302

Effect of Administration of Acepromazine Combined with Multi vitamin and Amino Acids Complex on Fertility Outcome, Blood Hematological and Biochemical Alterations and the Oxidative Stress Generated by Laparoscopic AI in Ewes

Abbas Farahavar[1*], Hamed Ahmadinejad[2], Daryush Aliour[3] Hasan Aliarabi[4]

1, 2, 3 and 4- Assistant Professor, M.Sc. Graduate, Associated Professor and Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, respectively.
*Corresponding Author's Email: a.farahavar@basu.ac.ir; Farahavar@gmail.com

Received: 03-01-2023 Revised: 28-02-2023 Accepted: 01-03-2023 Available Online: 01-03-2023	**How to cite this article:** Farahavar, A., Ahmadinejad, H., Aliour, D., & Aliarabi, H. (2023). Effect of administration of acepromazine combined with multi vitamin and amino acids complex on fertility outcome, blood hematological and biochemical alterations and the oxidative stress generated by laparoscopic AI in ewes. *Iranian Journal of Animal Science Research*, *16*(2), 287-302. (In Persian with English Abstract). http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83304.1158

Introduction: Farm animals face different types of abiotic stresses due to many management activities. Stress has adverse consequences on the animal's health and welfare. Laparoscopic artificial insemination (LAI) in sheep is also one of the mini surgery activities that associated with the use of sedatives, catching and fettering the animal, the insertion of instruments into the abdomen, and manipulation of the reproductive tract. All these actions are stressful and may impact stress axis, hematological and biochemical alterations, antioxidant status and fertility outcome. The administration of acepromazine combined with a multivitamin and amino acids complex may be a useful strategy for reducing stress in sheep undergoing laparoscopic AI.

Materials and Methods: In this experiment, 50 non-pregnant Afshar breed ewes, aged 3-4 years, with almost the same body weight and score, were used. The estrous cycle of the ewes was synchronized by flurogestone acetate loaded sponges and eCG hormone. At the time of sponge removal, the ewes were divided into two groups (n = 25). All of the ewes, 54 h after sponge removal, were exposed to stress caused by LAI. In the first group (treatment), with sponge removal, each ewe was received 10 ml of the Multiaminoject intramuscularly. Also, 20 min before LAI, in addition to Multiaminoject, each animal also received 0.0834 mg aspromazine (i.v) per kg of body weight. At the same time, the ewes of the second group were injected with physiological saline and were considered as control. Changes in plasma cortisol concentration and its kinetics were measured from zero (20 min before LAI) to 180 min after through serial blood sampling. Changes of hematological and biochemical parameters of jugular vein blood were evaluated 20 min before and 40 min after LAI. The plasma antioxidant status was measured at the times of sponge removal, LAI and 3 days after LAI. The pregnancy rate was recorded by ultrasound at 45 days.

Results and Discussion: Laparoscopic artificial insemination (AI) induced a stress response in the ewes, evidenced by a significant increase in cortisol concentration 20 minutes after the procedure compared to baseline levels ($P < 0.05$). In this study, the injection of acepromazine combined with a multivitamin and amino acid complex did not inhibit cortisol secretion during laparoscopic surgery, leading to the rejection of the research hypothesis. The reason for this discrepancy is related to the type of sedative used to reduce or eliminate pain during surgery. It has been reported that plasma cortisol response is reduced by ketoprofen and completely removed by detomidine. As a result, after LAI, the number of white blood cells and the plasma concentration of malodaldehyde increased and the hematocrit, hemoglobin and total antioxidant capacity decreased ($P < 0.05$), but the concentration of plasma proteins did not change ($P > 0.05$). Acute stressors cause a transient increase in the number of blood cells in the blood circulation. The cause of this phenomenon is the contraction of the spleen due to the stimulation of catecholamines. In addition, with the increase in cortisol secretion, blood cells are released

http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83304.1158

from the bone marrow into the bloodstream. In a study, the use of supplements containing various vitamins and minerals, one week before and one week after laparoscopic surgery, improved the antioxidant status of patients after surgery and the level of plasma malodaldehyde decreased significantly. The reason for not seeing a significant effect on antioxidant parameters in this research may be the type of supplement containing antioxidants and the time of its use before and after surgery. Injection of aspromazine combined with Multiaminoject increased plasma proteins and decreased the level of aspartate aminotransferase enzyme ($P< 0.05$). Stress, depending on its intensity and type, can cause tissue damage and the release of liver enzymes into the blood. Research has shown that transportation stress in pigs leads to increased plasma concentrations of aspartate aminotransferase and creatine kinase. Previous studies have reported the protective effects of vitamin and amino acid supplements in preventing liver damage. The decrease in enzyme concentration after laparoscopy in the treatment receiving aspromazine and multi amino acids may be related to its protective effects. The results of the study showed that there was no significant difference in fertility outcomes between the two groups ($P< 0.05$). The pregnancy rate for the acepromazine and Multiaminoject-treated group was 50%, while the pregnancy rate for the control group was 45%. This result is probably caused by the lack of interference or partial interference of aspromazine with uterine contractions around ovulation and conception.

Conclusion: The authors concluded that acepromazine combined with a multivitamin and amino acids complex, did not have a significant effect on fertility outcome, blood hematological and biochemical alterations and the oxidative stress generated by laparoscopic AI in ewes, but the severity of tissue damage reduce and plasma globulin concentration increase in response to acepromazine combined with a multivitamin and amino acids complex injection. It is important to note that this is just one study and that more research would be needed to confirm these findings.

Keywords: Acepromazine, Antioxidant status, Cortisol, Multiaminoject, Stress

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۰۲-۲۸۷

اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه ترکیب مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه بر بازده تولیدمثلی، تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خون و تنش اکسیداتیو ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی در گوسفند

عباس فرح آور*[1]، حامد احمدی نژاد[2] ، داریوش علیپور[3]، حسن علی عربی[4]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۱۹
تاریخ بازنگری:۱۴۰۲/۰۷/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۱

چکیده

آسپرومازین یک داروی آرام‌بخش است که معمولاً در حیوانات مزرعه‌ای برای کمک به کاهش اضطراب و تنش استفاده می‌شود. همچنین، مکمل‌های حاوی ترکیبی از انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه نیز می‌توانند علاوه‌بر حمایت از سلامت کلی حیوان، به کاهش اثرات منفی تنش کمک نمایند. مطالعات کمی در مورد استفاده از ترکیب آسپرومازین به‌همراه ترکیب مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه بر کاهش اثرات تنش القا شده هنگام انجام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی در گوسفند وجود دارد. بنابراین، هدف از این پژوهش، بررسی اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه یک مکمل تجاری حاوی ترکیبی از ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه (مولتی-آمینوجکت) بر بازده تولیدمثلی، تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خون و تنش اکسیداتیو ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی در گوسفند بود. پنجاه راس میش غیر آبستن نژاد افشار با سن ۳-۴ سال، وزن زنده ۵/۲۴±۵۷/۷۵ کیلوگرم و نمره بدنی حدود ۴-۳/۵ توسط اسفنج حاوی فلوجستون استات و هورمون eCG همزمان شدند. برای این منظور، اسفنج به‌مدت ۱۴ روز در واژن میش‌ها قرار داده شد. در روز خارج‌سازی اسفنج به هر راس دام ۵۰۰ واحد بین‌المللی eCG تزریق شد. میش‌ها هنگام خارج‌سازی اسفنج به دو گروه ۲۵ راسی تقسیم و ۵۴ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج، تحت تأثیر تنش تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی قرار گرفتند. به میش‌های گروه اول (شاهد) فقط سرم فیزیولوژی تزریق شد. به میش‌های گروه دوم هنگام خارج‌سازی اسفنج، ۱۰ میلی‌لیتر مکمل مولتی‌آمینوجکت (عضلانی) تزریق شد. همچنین، هر حیوان ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی علاوه‌بر مولتی آمینوجکت، ۰/۰۸۳۴میلی‌گرم آسپرومازین به‌ازای هر کیلوگرم وزن زنده (داخل‌رگی) نیز دریافت کرد. تغییرات غلظت کوتیزول پلاسما و کینتیک آن از ۲۰ دقیقه قبل از انجام لاپاراسکوپی تا ۱۸۰ دقیقه بعد از آن اندازه‌گیری شد. تغییرات هماتولوژیکی و بیوشیمیایی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما قبل و بعد از لاپاراسکوپی در خون وداجی ارزیابی و میزان آبستنی در ۴۵ روزگی تعیین شد. غلظت کورتیزول ۲۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت پایه افزایش یافت. متعاقب پاسخ کورتیزول، تعداد گلبول‌های سفید خونی و غلظت مالون‌دی‌آلدهید پلاسما افزایش و هماتوکریت، هموگلوبین و توان آنتی‌اکسیدانی کل کاهش یافت، امّا غلظت پروتئین‌های پلاسما تغییر نکرد. میزان آبستنی تحت تأثیر تیمار قرار نگرفت، اما پروتئین پلاسما افزایش و آنزیم آسپارتات آمینوتراسفراز را کاهش داد. به‌طور کلی، تزریق آسپرومازین به‌همراه مکمل تجاری مولتی‌آمینوجکت هنگام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی تأثیری بر نتیجه باروری و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی پس از لاپاراسکوپی ندارد، امّا با کاهش غلظت پلاسمایی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز، شدت آسیب بافتی را کاهش و با افزایش غلظت گلبولین پلاسما سامانه ایمنی حیوان را تقویت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آسپرومازین، تنش، کورتیزول، مولتی‌آمینوجکت، وضعیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

حیوانات مزرعه‌ای به‌خاطر بسیاری از فعالیت‌های مدیریتی با انواع مختلف تنش‌های غیرزیستی مواجه هستند. تنش دارای پیامدهای نامطلوب بر وضعیت سلامت و رفاه حیوان است (Yardimci *et al.*, 2013). پاسخ حیوان به تنش نه تنها به ماهیت عوامل تنش‌زا و شدت

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب استادیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: a.farahavar@basu.ac.ir)
http://doi.org/10.22067/ijasr.2023.83304.1158

آن بستگی دارد، بلکه به استعداد ذاتی حیوان و خلق‌وخوی آن نیز مرتبط است. کنترل پاسخ تنش در حیوانات مزرعه‌ای این امکان را فراهم می‌کند تا درک بهتری از وضعیت رفاه حیوان داشته باشیم و شرایط نگهداری و پرورش مناسب‌تری را برای بازدهی بیشتر و یا تولید با کیفیت‌تر فراهم نماییم (Grandin, 2021). هنگام تنش، سیستم درون‌ریز تحریک شده و کورتیکواستروئیدهای خون افزایش می‌یابد که پیامد آن تغییر در وضعیت ایمنی، دفاع آنتی‌اکسیدانی، باروری و فراسنجه‌های بیوشیمیایی و هماتولوژیکی است (Arfuso ;Damián and Ungerfeld, 2011; Laher, 2014; *et al*., 2022 Önder *et al*., 2023; Priskas *et al*., 2022). آرفوسو و همکاران (Arfuso *et al*., 2022) نشان دادند که پشم چینی در گوسفند باعث کاهش غلظت آلبومین و افزایش پروتئین‌های فاز حاد بویژه گلبولین‌ها می‌شود. دومیان و آنگرفلد (Damián and Ungerfeld, 2011) نشان دادند که در قوچ اسپرم‌گیری به‌وسیله الکترواجاکلاتور باعث افزایش غلظت کورتیزول، کاهش تستوسترون، تغییر در تعداد ضربان قلب و فراسنجه‌های هماتولوژیکی و و بیوشیمیایی خون می‌شود. اوندر و همکاران (Önder *et al*., 2023) نشان دادند که در گوسفند در برنامه‌های تلقیح مصنوعی به‌روش گذار از گردن رحم و انتقال جنین، تلاش برای عبور دادن ابزارهای کمک تولیدمثلی از دهانه رحم باعث افزایش غلظت کورتیزول خون و کاهش توان آنتی‌اکسیدانی می‌گردد.

تلقیح مصنوعی یک ابزار کارآمد برای بهبود ژنتیکی حیوانات است. با این حال، کاربرد آن در گوسفند به‌دلیل نتایج متناقض نسبتاً محدود است، زیرا موفقیت روش به عوامل زیادی بستگی دارد. تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) نسبت به تلقیح مصنوعی به‌روش سنتی دارای برتری است، از جمله افزایش دقت و نرخ لقاح بالاتر دارد (Lone, 2022)، و معایب قابل توجهی نیز دارد که قبل از تصمیم به استفاده از این روش در برنامه‌های پرورش گوسفند باید مورد توجه قرار گیرد. تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی می‌تواند برای گوسفند تنش‌آفرین باشد، زیرا کاربرد این روش مستلزم مقید کردن حیوان، استفاده از داروهای آرام‌بخش، قرار دادن ابزارهای لاپاراسکوپی در داخل محوطه شکمی و دستکاری دستگاه تناسلی است (Stafford *et al*., 2006). سطح تنش بسته به هر گوسفند، مهارت تکنسین تلقیح، کیفیت آرام‌بخش و مراقبت‌های بعد از تلقیح می‌توانند متفاوت باشد (Small *et al*., 2021). در شرایط مزرعه، استفاده از آرام‌بخش‌ها، الکترولیت‌ها یا مکمل‌های حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها برای کاستن از اثرات نامطلوب ناشی از انواع مختلف تنش توصیه می‌شود (Ali and Al-Ali *et al*., 2006 ; Qarawi, 2002; Danyer *et al*., 2021). آسپرومازین، یک داروی آرام‌بخش است که معمولاً در دامپزشکی برای کمک به کاهش اضطراب و تنش در حیوانات استفاده می‌شود. مکمل‌های حاوی ترکیبی از انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه نیز می‌تواند به حمایت از سلامت کلی حیوان و کاهش اثرات منفی تنش بر بدن کمک کند (Danyer *et al*., 2021) اما، در مورد نقش تجویز آسپرومازین همراه با انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه بر پاسخ محور تنش، تغییرات هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و نتیجه باروری پس از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی مستندات علمی کمی وجود دارد. براساس فرضیه این پژوهش، تجویز آسپرومازین همراه با انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه ممکن است یک راهکار مفید برای کاهش تنش در گوسفندان تحت لاپاروسکوپی باشد. بنابراین، هدف از این مطالعه، بررسی تزریق آسپرومازین همراه با یک مکمل تجاری حاوی ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه (مولتی‌آمینوجکت) هنگام LAI بر پاسخ محور تنش، تغییرات هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون، وضعیت آنتی‌اکسیدانی و نتیجه باروری بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی و آماده‌سازی حیوانات

در فصل غیر تولیدمثلی پنجاه راس میش غیرآبستن نژاد افشار با سن ۳–۴ سال وزن زنده ۵/۲۴ ±۵۷/۷۵ کیلوگرم و نمره بدنی حدود ۳/۵–۴ انتخاب و در شرایط تغذیه‌ای و مدیریتی مشابه در طول آزمایش نگهداری شدند. برای همزمان‌سازی فحلی از اسفنج آغشته به ۶۰ میلی‌گرم فلوجستون استات (هیپرای اسپانیا) به‌مدت ۱۴ روز و ۵۰۰ واحد بین‌المللی eCG (هیپرای اسپانیا) در زمان خارج‌سازی اسفنج استفاده گردید. همه میش‌ها ۵۴ ساعت پس از خارج‌سازی اسفنج، تحت تأثیر تنش ناشی از جراحی لاپاراسکوپی برای انجام تلقیح مصنوعی قرار گرفتند. در گروه اول هنگام خارج‌سازی اسفنج، به هر حیوان ۱۰ میلی‌لیتر از یک مکمل تجاری حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین (مولتی آمینوجکت، رویان دارو، ایران) به‌صورت عضلانی تزریق شد. همچنین هر حیوان ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی، علاوه‌بر دریافت مولتی آمینوجکت، ۰/۰۸۳۴ میلی‌گرم آسپرومازین (به‌شکل آسپرومازین مالات، شرکت Pasteur رومانی) به‌ازای هر کیلوگرم وزن زنده به‌صورت داخل‌رگی دریافت کردند. همزمان به میش‌های گروه دوم سرم فیزیولوژی تزریق و به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. ترکیب ویتامینی و اسید آمینه‌ای هر میلی‌لیتر مکمل تزریقی مولتی‌آمینوجکت براساس گزارش شرکت داروسازی مربوطه در جدول ۱ نشان داده شده است.

انجام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی

قبل از انجام لاپاراسکوپی ابتدا همه میش‌ها به‌مدت ۱۸ ساعت از آب و خوراک محروم شدند. سپس هر میش بر روی تخت لاپاراسکوپی (کریدل) مقید و پس از ضدعفونی موضع تلقیح، دو سوراخ توسط تروکار در طرفین خط شکمی و نزدیک به پستان ایجاد

و محوطه شکمی توسط گاز CO_2 باز گردید. شاخ‌های رحمی با استفاده از تلسکوپ لاپاراسکوپی (لنز صفر درجه با قطر پنج میلی‌متر ولف، آلمان) متصل به منبع نور سرد (Aesculap، آمریکا) رویت و ۰/۵ میلی‌لیتر منی توسط پیپت تلقیح لاپاراسکوپی آسپیره و به دو بخش تقسیم و هر بخش به یک شاخ رحمی تلقیح گردید. عملیات مهار کردن هر گوسفند و بستن آن روی کریدل، انجام لاپاراسکوپی و آزادسازی آن، کمتر از پنج دقیقه طول کشید.

جدول ۱- ترکیب هر میلی‌لیتر مولتی آمینوجکت (براساس گزارش شرکت تولیدکننده دارو)

Table 1– The composition of each milliliter of multiaminoject (according to the report of the drug manufacturing company)

ویتامین A	۱۵۰۰۰ واحد بین‌المللی	دی پانتنول	۲۵ میلی‌گرم
Vitamin A	15000 IU	D-panthenol	25 mg
ویتامین D_3	۷۵۰۰ واحد بین‌المللی	نیکوتینامید	۵۰ میلی‌گرم
Vitamin D3	7500 IU	Nicotinamide	50 mg
ویتامین E	۲۰ میلی‌گرم	اسیدفولیک	۱۵۰ میکروگرم
Vitamin E	20 mg	Folic Acid	150 µg
ویتامین B_1	۱۰ میلی‌گرم	بیوتین	۱۲۵ میکروگرم
Vitamin B_1	10 mg	Biotin	125 µg
ویتامین B_2	۵ میلی‌گرم	کولین کلراید	۱۲/۵ میلی‌گرم
Vitamin B_2	5 mg	Choline chloride	12.5 mg
ویتامین B_6	۳ میلی‌گرم	اسیدهای آمینه (لیزین، متیونین، آرژنین و گلایسین)	۱۲ میلی‌گرم
Vitamin B_6	3 mg	Amino acids (lysine, methionine, arginine and glycine)	12 mg
ویتامین B_{12}	۶۰ میکروگرم		
Vitamin B_{12}	60 µg		

۱- شرکت داروسازی رویان داور، تهران، ایران

1- Rooyan Darou Pharmaceutical Co. Tehran, Iran

برای تلقیح لاپاراسکوپی از تکنسین کاملاً باتجربه استفاده شد. برای تلقیح از منی تازه انزال شده یک قوچ افشار- برولا که باروری آن قبلا به اثبات رسیده بود استفاده شد. قوچ مورد استفاده در این پژوهش، دو ماه قبل از شروع آزمایش سه ایمپلنت ۱۸ میلی‌گرمی ملاتونین (ریگولین، شرکت Ceva، فرانسه) در زیر گوش آن کاشته شده بود. اسپرم‌گیری با استفاده از واژن مصنوعی انجام شد. منی اخذ شده پس از ارزیابی مقدماتی، توسط رقیق‌کننده بر پایه شیر خشک (DNAbiotech) و پنج درصد زرده تخم مرغ و۵۰۰ واحد بین‌المللی پنی‌سیلین و ۵۰۰ میکروگرم استرپتومایسین (DNAbiotech) در هر میلی‌لیتر رقیق شد. غلظت نهایی اسپرم برای تلقیح ۱۰۰ میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر بود. منی رقیق شده در زمان تلقیح، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و بلافاصله تلقیح انجام شد (Fierro *et al.*, 2011).

ارزیابی پاسخ محور تنش

برای بررسی پاسخ محور تنش و خصوصیات پاسخ کورتیزول پس از لاپاراسکوپی، از هر گروه پنج راس میش به‌طور تصادفی جدا و درون باکس‌های انفرادی قرار داده شد. ابتدا ۲۰ دقیقه قبل از انجام لاپاراسکوپی، ۱/۵ میلی‌لیتر خون از طریق ورید وداج اخذ و سپس جراحی لاپاراسکوپی برای انجام تلقیح مصنوعی انجام شد. میش‌ها پس از لاپاراسکوپی از کریدل پیاده و به داخل باکس‌های انفرادی هدایت شد. سپس خونگیری‌های سریالی در زمان‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی انجام گردید. خون های اخذ شده به داخل لوله‌های حاوی K_2EDTA تخلیه و پس از سانتریفیوژ و جداسازی پلاسما و تا زمان اندازه‌گیری غلظت کورتیزول در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت کورتیزول پلاسما به‌روش الایزای رقابتی و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت (ایده‌آل تشخیص) اندازه‌گیری شد. حداقل میزان قابل اندازه‌گیری برای کوتیزول ۰/۴ µg/dl و مقدار ضریب تغییرات دورن سنجش آن ۴/۵ درصد بود. خصوصیات پاسخ کورتیزول شامل غلظت پایه، غلظت پیک، میزان تغییر نسبت به پایه، طول مدت پاسخ و مساحت زیر منحنی ۰ تا ۹۰ و ۰ تا ۱۸۰ دقیقه به‌عنوان ملاک پاسخ یکپارچه کورتیزول به‌روش محاسبه مساحت ذوزنقه محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی خون

برای ارزیابی فراسنجه‌های هماتولوژی، ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی نمونه خون سیاهرگ وداج به درون لوله‌های حاوی K_2.EDTA جمع‌آوری و تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌ها در دمای پنج درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، درصد هماتوکریت و غلظت

هموگلوبین، MCV و MCH توسط دستگاه سل کانتر اتوماتیک هماتولوژی (Sysmex-KX21N، ژاپن) اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی نمونه خون سیاهرگ وداج به درون لوله حاوی ضد انعقاد هپارین و سدیم فلوراید جمع‌آوری و به‌کمک سانتریفیوژ (OSK ژاپن، با قدرت ۱۷۰۰ g به‌مدت ۱۵ دقیقه) پلاسمای آن جدا گردید. پلاسمای تهیه شده تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌ها در فریز ۲۰- نگهداری شد. غلظت گلوکز پلاسما به‌روش آنزیمی- کالریمتری، پروتئین کل به‌روش فتومتریک بیوره، آلبومین به روش فتومتریک بروم کروزول گرین و فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز براساس روش توصیه شده IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و علوم آزمایشگاهی) و توسط کیت‌های شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) و به‌کمک دستگاه اسپکتروفتومتراندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی کل و مالون دی آلدهید پلاسما

میزان توان آنتی‌اکسیدانی کل و غلظت مالون دی آلدهید پلاسما در زمان خارج‌سازی اسفنج، ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی و همچنین سه روز بعد از لاپاراسکوپی اندازه‌گیری شد. برای این منظور، نمونه خون سیاهرگ وداج در زمان‌های ذکر شده به داخل لوله حاوی هپارین جمع‌آوری و پلاسمای تهیه شده تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌ها در فریز ۸۰- نگهداری شد. وضعیت آنتی اکسیدانی از طریق اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما به‌روش فراپ (Hsieh and Rajashekaraiah, 2021) و غلظت مالون دی-الدهید پلاسما از طریق ارزیابی غلظت ترکیبات واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید (De Leon and Borges, 2020) تعیین شد.

تشخیص آبستنی

آبستنی میش‌ها ۴۵ روز پس از تلقیح لاپاراسکوپی با استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی مجهز به پروب کانوکس ۳/۵ مگاهرتز (Sonosite، اسپانیا) به‌روش معاینه شکمی تشخیص داده شد.

آنالیز آماری

داده‌های مربوط به خصوصیات پاسخ کورتیزول به‌روش آنالیز واریانس و در قالب طرح کاملاً تصادفی و داده‌های مربوط به توان آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما، غلظت مالون دی آلدهید پلاسما، فراسنجه‌های متابولیکی و هماتولوژی و غلظت کورتیزول در خونگیری‌های سریالی در قالب طرح کاملاً تصادفی با اندازه گیری های تکرار شده در زمان به‌کمک نرم افزار SAS (ورژن ۹/۴) و رویه GLM تجزیه و تحلیل شد. درصد آبستنی در ۴۵ روزگی با استفاده از آزمون کای مربع و رویه Freq و به‌کمک نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل گردید. به‌دلیل احتمال اثرات منفی تنش ناشی از خونگیری های سریالی، داده‌های آبستنی میش‌های جداسازی شده برای تعیین کینتیک کورتیزول پلاسما در آنالیز آماری مورد استفاده قرار نگرفت. اختلاف بین میانگین زمان‌های نمونه‌گیری با استفاده از آزمون دانکن با احتمال خطای کمتر از پنج درصد (p<۰/۰۵) مقایسه شد. همچنین از آزمون t- student برای مقایسه بین دو تیمار استفاده گردید.

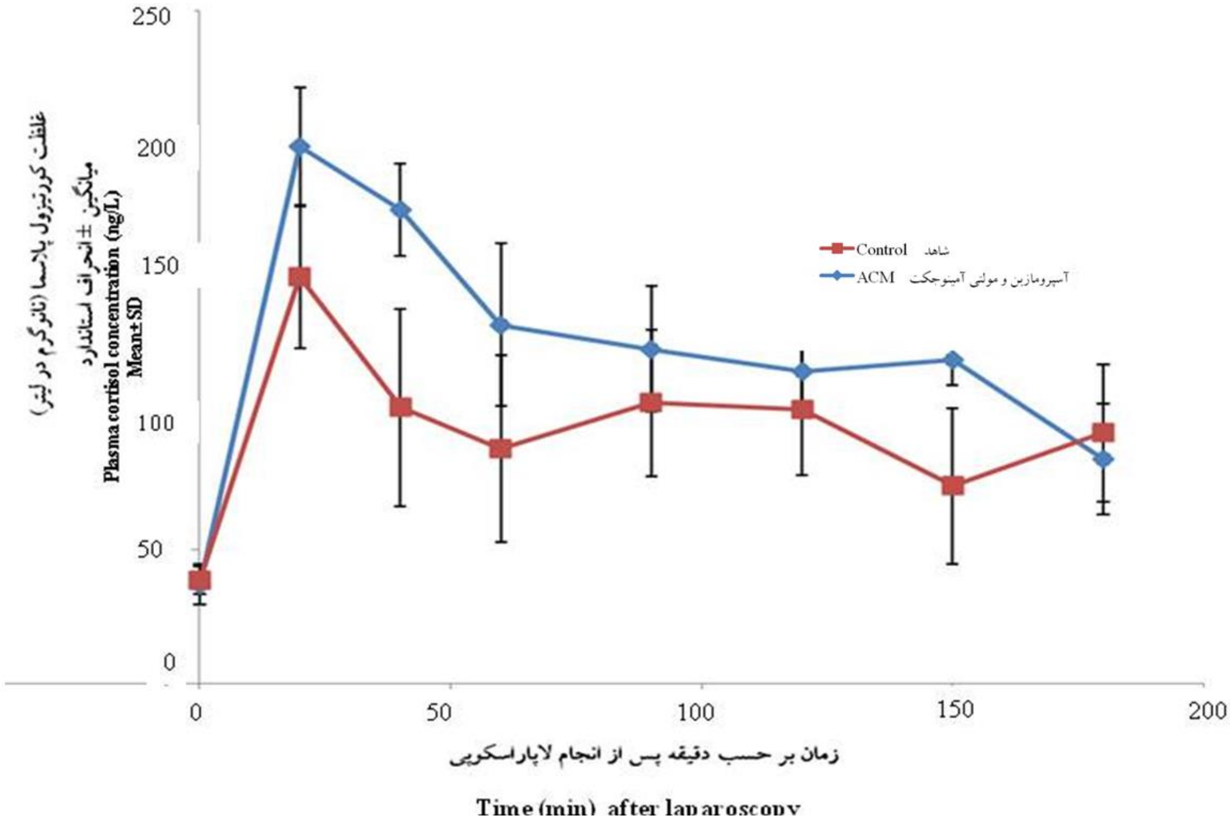
نتایج و بحث

پاسخ محور تنش

نتایج مربوط به تغییرات غلظت کورتیزول پلاسما از ۲۰ دقیقه قبل از انجام لاپاراسکوپی تا ۱۸۰ دقیقه بعد از آن در شکل ۱ و کینتیک کورتیزول پلاسما در جدول ۲ نشان داده شده است. غلظت پایه کورتیزول پلاسما بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت. انجام عمل لاپاراسکوپی باعث افزایش غلظت کورتیزول پلاسمای میش‌ها شد، به‌طوری‌که پیک کوتیزول ۲۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی مشاهده گردید و غلظت کوتیزول در این زمان به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت پایه بالاتر بود (P< ۰/۰۵).

غلظت کورتیزول در پیک تحت تأثیر تیمار قرار نگرفت و تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تأثیری بر غلظت کورتیزول در پیک نداشت، امّا از نظر عددی میانگین غلظت کورتیزول در میش های تیمار شده بیشتر از میش‌های گروه شاهد بود. مدت زمان پاسخ و همچنین مساحت زیر منحنی، ۹۰ و ۱۸۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی بین تیمارها تفاوتی نداشت. این نتیجه با نتایج استافورد و همکاران (Stafford *et al.*, 2006) همخوانی داشت. آن‌ها نشان دادند که مقید کردن گوسفند روی کریدل و انجام لاپاراسکوپی باعث افزایش قابل توجه سطح کورتیزول پلاسما می‌گردد و استفاده از آسپرومازین نمی‌تواند ترشح کورتیزول را مهار نماید. همچنین مشابه نتایج این پژوهش در مطالعه‌ای نشان داده شد که در گاوهایی که تحت تنش حمل و نقل قرار داشتند، تزریق آسپرومازین قبل از شروع تنش، غلظت پلاسمایی کورتیزول را نسبت به گاوهای گروه شاهد که فقط سرم فیزیولوژی دریافت کرده بودند، کاهش نداد (Brearley *et al.*, 1990). آماده‌سازی گوسفند برای تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی شامل اقداماتی از قبیل محروم‌سازی آن از آب و خوراک به‌مدت حداقل ۱۸ ساعت قبل از لاپاراسکوپی، گرفتن و مقید کردن حیوان روی تخت لاپاراسکوپی، سوراخ کردن پوست ناحیه شکمی توسط تروکار، تزریق گاز CO_2 به محوطه شکمی و دستکاری اندام-های داخلی به‌منظور یافتن دستگاه تولید مثلی و تلقیح است. همه این اقدامات منابع بالقوه القاء تنش هنگام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی هستند. تنش باعث فعال شدن محور هیپوتالاموس-

هیپوفیز-آدرنال (HPA) می‌شود که نتیجه آن، ترشح کوتیزول و کاته‌کولامین‌ها به داخل خون است. در این پژوهش، تزریق مولتی آمینوجکت به‌همراه آرام‌بخش آسپرومازین نتوانست ترشح کورتیزول را هنگام جراحی لاپاراسکوپی مهار نماید و باعث رد فرضیه این پژوهش گردید. تأثیر آرام‌بخش‌های مختلف بر کاهش سطح تنش و کنترل پاسخ کورتیزول با هم متفاوت است و علت این تناقض به نوع آرام‌بخش مورد استفاده برای کاهش یا رفع احساس درد در هنگام جراحی مربوط است. گزارش شده است که پاسخ کورتیزول پلاسما هنگام استفاده از کتوپروفن کاهش می‌یابد و توسط دتومیدین به‌طور کامل رفع می‌گردد (Stafford *et al.*, 2006).



[1] شاهد: فقط سرم فیزیولوژی تزریق گردید. تیمار ACM (آسپرومازین و مولتی آمینوجکت): هنگام خارج‌سازی اسفنج، به هر حیوان ۱۰میلی‌لیتر مکمل مولتی آمینوجکت (عضلانی) تزریق شد. همچنین، هر حیوان ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی علاوه‌بر مولتی آمینوجکت، ۰/۰۸۳۴میلی‌گرم آسپرومازین به ازای هر کیلوگرم وزن زنده (داخل‌رگی) نیز دریافت کرد. تغییرات غلظت کوتیزول پلاسما در بازه زمانی صفر (۲۰ دقیقه قبل از انجام لاپاراسکوپی) تا ۱۸۰+ (۱۸۰ دقیقه بعد از انجام لاپاراسکوپی) اندازه‌گیری شده است.

[1] Control: received only saline. ACM group: with sponge removal, each ewe was received 10 ml of the Multiaminoject (IM). Also, 20 min before LAI, in addition to Multi Aminoject, each animal received 0.0834 mg Aspromazine (i.v) per kg of body weight. Changes in plasma cortisol concentrations were measured from zero (20 min before LAI) to 180 min after.

شکل ۱- تغییرات غلظت کورتیزول پلاسما در میش‌ها پس از انجام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه یک مکمل تجاری حاوی مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه (مولتی آمینوجکت).[1]

Figure 1- Changes of plasma cortisol concentration of ewes after performing laparoscopic artificial insemination (LAI) and the effect of Acepromazine combined with a commercial supplement contained multi-vitamins and amino acids (Multi Aminoject). [1]

در مطالعه دیگری، نشان داده شد که زایلازین و دتومیدین باعث کاهش سطح تنش در بزها هنگام انتقال جنین‌های کلون شده به‌روش لاپاراسکوپی می‌گردد (Aghamiri *et al.*, 2022) دتومیدین معمولاً به‌عنوان یک آرام‌بخش برای تسهیل روش‌های جراحی و به‌عنوان یک داروی بیهوشی در اسب استفاده می‌شود. این ماده معمولاً در گوسفند استفاده نمی‌شود، امّا نشان داده شده است که در این گونه حیوانی حالت ضد درد ایجاد می‌کند (Stafford *et al.*, 2006). در این پژوهش، غلظت پلاسمایی کورتیزول در تیمار دریافت‌کننده آسپرومازین به‌همراه مولتی‌آمینوجکت به‌طور جزئی (غیر معنی‌دار) بیشتر از شاهد بود. استافورد و همکاران (Stafford *et al.*, 2006) که نشان دادند که تسکین درد با استفاده از آسپرومازین باعث تحریک جزئی محور HPA و افزایش کوتاه‌مدت کورتیزول پلاسما هنگام

لاپاراسکوپی در گوسفند می‌شود. نتایج این پژوهش با نتایج آن‌ها هم‌خوانی داشت. همچنین نشان داده شده است که تزریق آسپرومازین هنگام تنش حمل و نقل، کورتیزول پلاسما را افزایش می‌دهد (Brearley *et al.*, 1990) که با نتیجه این پژوهش مطابقت دارد. علت افزایش کورتیزول پلاسما (هایپرکوتیزولیما) پس از تزریق آسپرومازین، به‌مدت اثر این دارو مربوط است. آسپرومازین نسبتاً طولانی اثر بوده و پس از تزریق باعث تحریک ترشح هورمون‌های آدرنالین و آدرنوکورتیکوتروپین (ACTH) می‌شود که می‌تواند باعث افزایش کورتیزول پلاسما گردد (Ali and Al-Qarawi, 2002). نشان داده شده است که تزریق آسپرومازین و همزمان شروع تنش حمل و نقل، کورتیزول پلاسما را بیشتر از زمانی که تنش وجود ندارد افزایش می‌دهد (Brearley *et al.*, 1990).

جدول ۲- کینتیک کورتیزول پلاسما (بر حسب نانوگرم در لیتر) در پاسخ به انجام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی و تأثیر استفاده از آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی مولتی ویتامین و اسیدهای آمینه (مولتی آمینوجکت) بر فراسنجه‌های پاسخ در میش‌های نژاد افشار[1]

Table 2- Plasma cortisol kinetic (ng/L) to perform laparoscopic artificial insemination (LAI) and the effect of administration of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multiaminoject) on response parameters in Afshar ewes[1]

تیمارها Treatments	غلظت پایه Basal concentration	غلظت پیک Peak concentration	میزان تغییر (پایه- پیک) Change (peak- Basal)	مساحت زیر منحنی (۰-۹۰)[2] $AUC_{(0-90)}^2$ (nmol/min/L) $10^3\times$	مساحت زیر منحنی (۰-۱۸۰) $AUC_{(0-180)}$ $10^3\times$(nmol/min/L)
شاهد Control	38.65	151.27	112.61	9.21	17.44
آسپرومازین و مولتی آمینوجکت ACM[3]	37.02	199.39	162.37	13.07	23.27
SEM	5.090	23.341	19.712	2.033	3.601
P-value	0.8614	0.1915	0.1208	0.2164	0.2852

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

۲-AUC: مساحت زیر منحنی نمودار کورتیزول است که برای بازه‌های زمانی صفر تا ۹۰ و صفر تا ۱۸۰ محاسبه شده است و به‌عنوان پاسخ یکپارچه کورتیزول در نظر گرفته شده است.

۳-ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).

2- AUC is area under curve for cortisol which is calculated for the time period 0 to 90 and 0 to 180 and considered as integrated .cortisol response.3-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject

علاوه‌بر آرام‌بخش‌ها، تأثیر استفاده از انواع مکمل‌های حاوی الکترولیت‌ها، ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه برای مهار ترشح کورتیزول هنگام مواجه با عوامل تنش‌زا در مطالعات مختلف گزارش شده است (Tsuda *et al.*, 2020). استفاده از مکمل‌های حاوی انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه در مواقع استرس ناشی از واکسیناسیون، حمل و نقل، رطوبت بالا، درجه حرارت بالا، تغییرات ناگهانی درجه حرارت باعث کاهش اثرات نامطلوب تنش می‌گردد (Nayyar and Jindal, 2010). در این پژوهش، استفاده از تزریق همزمان مولتی آمینوجکت با آسپرومازین تأثیری بر مهار ترشح کورتیزول نداشت (جدول ۲). نشان داده شده‌است که گرسنگی کوتاه مدت باعث تخلیه بدن از گلیکوژن و کاهش گلوکز خون می‌شود که باعث تحریک ترشح کورتیزول می‌گردد (Kiyma *et al.*, 2004). همسو با نتایج این پژوهش، گزارش شده‌است که در انسان استفاده از اسیدهای آمینه شاخه‌دار قبل‌از انجام تمرینات ورزشی مقاومتی و طولانی‌مدت پاسخ کورتیزول را تحت تأثیر قرار نداد (Tsuda *et al.*, 2020). در مطالعه دیگری، مصرف مکمل‌های حاوی اسیدهای آمینه شاخه‌دار ضروری و تائورین تأثیر معنی‌داری بر ترشح کورتیزول نداشت (Hoffman *et al.*, 2008). بر خلاف نتایج این پژوهش، در مطالعه‌ای استفاده از آرژنین باعث افزایش متابولیسم لیپید در جوندگان و انسان و حفظ سطح گلوکز خون و گلیکوژن کبد گردید و پیشنهاد گردید که احتمالاً آرژنین می‌تواند باعث مهار ترشح کورتیزول شود (Jobgen *et al.*, 2009; McKnight *et al.*, 2010). توانایی سرکوب ترشح کورتیزول توسط نوع مکمل‌های ویتامینی و اسید آمینه‌ای متفاوت است و بستگی به ترکیب و غلظت آن در هر مکمل دارد. ترکیب اسیدآمینه‌ای مورد استفاده در این پژوهش حاوی لیزین، متیونین، آرژنین و گلایسین بود که می‌تواند علت مغایر بودن نتایج این پژوهش با مطالعات سایر محققین باشد. البته شایان ذکر است که علت عدم تأثیر تزریق مولتی آمینوجکت بر مهار ترشح کورتیزول ممکن است به شدت و نوع عامل تنش زا، نوع و ترکیب اسید آمینه و نوع گونه حیوانی نیز بستگی داشته باشد.

فراسنجه‌های هماتولوژیکی و بیوشیمیایی

اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر تغییرات فراسنجه‌های هماتولوژیکی ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی در جدول ۳ نشان داده شده است. تعداد گلبول‌های سفید خونی و غلظت گلوکز پلاسما ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی نسبت به

۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی به‌طور معنی‌داری بیشتر و درصد هماتوکریت، غلظت هموگلوبین، حجم متوسط گلبول‌های قرمز (MCV) و غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) کمتر بود (P< ۰/۰۵)، امّا تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تأثیری بر این فراسنجه‌ها نداشت. اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر تغییرات بیوشیمیایی خون ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی در جدول ۴ نشان داده شده است. غلظت پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین پلاسما ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی تفاوت معنی‌داری با قبل از لاپاراسکوپی نداشت، امّا غلظت فراسنجه‌های ذکر شده در تیمار دریافت‌کننده آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بیشتر از شاهد بود (P< ۰/۰۵).

گزارش شده‌است که عوامل تنش‌زای حاد باعث افزایش گذرای تعداد سلول‌های خونی در گردش خون می‌شود. این پدیده ناشی از انقباض طحال در اثر تحریک کاته‌کولامین‌هاست. همچنین، هنگام تنش، با میانجی‌گری کورتیزول، یک نوع رهاسازی سلول‌های خونی از مغز استخوان به جریان خون نیز رخ می‌دهد (Arfuso *et al.*, 2023). براساس نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، برخی از فراسنجه‌های هماتولوژیکی ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی به‌طور معنی‌داری نسبت به قبل از لاپاراسکوپی متفاوت بود (P< ۰/۰۵). در این پژوهش، افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی پس از تنش ناشی از لاپاراسکوپی، با یافته‌های مطالعات پیشین همسو بود (Arfuso *et al.*, 2023). گزارش شده است که تنش‌های روانی و همچنین احساس درد، سیستم هماتولوژیکی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی می‌شود (Ballou *et al.*, 2013).MCH در میش‌ها ۵ و ۱۲۰ دقیقه بعد از عملیات پشم‌چینی تفاوت معنی‌داری با قبل از آن ندارد. همسو با نتایج پژوهش حاضر، علی و همکاران (Ali *et al.*, 2006) نشان دادند که تزریق زایلازین و سدیم بتائین قبل از حمل و نقل تأثیری بر تغییرات هماتولوژیکی رخ داده در اثر تنش حمل و نقل ندارد. علت نتایج متناقض به زمان نمونه‌گیری مربوط است.

جدول ۳- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر پیش تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین بر تغییرات فراسنجه‌های هماتولوژیک در گوسفندان نژاد افشار[۱].

Table 3- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multiaminoject) on hematologic parameters alterations in Afshar ewes.[1]

تیمارها Treatments	WBC×(10³ µl)[2]	RBC×(10⁶ µl)[2]	Hct (%)[4]	Hb (g/dl)5[4]	MCV (fl)[6]	MCH (Pg)[7]
شاهد Control	8.70	9.64	31.90	10.38	34.09	11.12
آسپرومازین و مولتی آمینوجکت ACM[8]	8.46	9.75	32.63	10.86	34.99	11.48
SEM	0.563	0.452	1.075	0.375	1.791	0.638
Time						
۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی 20 min before laparoscopy	8.04	9.80	34.13	11.58	39.40	13.10
۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی 40 min after laparoscopy	9.50	10.11	29.89	9.55	29.71	9.47
SEM	0.480	0.573	1.162	0.341	1.801	0.595
P-value						
Treat	0.8703	0.8554	0.7331	0.6650	0.8967	0.8952
Time	0.0467	0.7021	0.0121	0.0003	0.0005	0.0001
Treat×time	0.2740	0.4313	0.4928	0.4597	0.9765	0.7981

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

۲-WBC: تعداد گلبول‌های سفید خونی (بر حسب تعداد در هر میکرولیتر خون)، ۳-RBC: تعداد گلبول‌های قرمز خونی (بر حسب تعداد در هر میکرولیتر خون)، ۴- Hct: هماتوکریت (بر حسب درصد)، ۵-Hb: غلظت هموگلوبین خون (بر حسب گرم در دسی‌لیتر)، ۶- MCV: حجم متوسط گلبول‌های قرمز (بر حسب فمتولیتر)، ۷- MCH: مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول‌های قرمز (بر حسب پیکوگرم)، ۸- ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).

2-WBC: white blood cells (cells number per micro liter of blood), 3-RBC: red blood cells (cells number per micro liter of blood), 4-Hct: Hematocrit, 5- Hb: hemoglobin concentration, 6- MCV: mean corpuscular volume (femtolitter), 7- MCH: mean corpuscular hemoglobin (picogram), 8-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject.

در این پژوهش، تیمار آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تعداد گلبول‌های سفید خونی را تحت تأثیر قرار نداد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تیمار یاد شده نتواست افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی و افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی را مهار کند که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش بالوآ و همکاران (Ballou *et al.*, 2013) مغایرت داشت، آن‌ها نشان دادند که اخته کردن و شاخبری باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی می شود و استفاده از آرام‌بخش افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی را مهار می‌کند (Ballou *et al.*, 2013). همسو با این پژوهش، دامیان و آنگرفلد (Damián and Ungerfeld, 2011) نشان دادند که اسپرم‌گیری از قوچ با استفاده از الکترواجاکولاتور باعث افزایش گلوکز پلاسما و کاهش هماتوکریت و هموگلوبین می‌شود. علی و همکاران (Ali *et al.*, 2006) نیز نشان دادند که حمل جاده‌ای گوسفند و بز باعث کاهش هماتوکریت و افزایش هموگلوبین می‌گردد. برخلاف یافته این پژوهش، ۴۰ ساعت حمل نقل باعث افزایش درصد هماتوکریت و هموگلوبین در تلیسه‌ها شد (Avila-Jaime *et al.*, 2021). همچنین پارکر و همکاران (Parker *et al.*, 2004) تغییری در درصد هماتوکریت گاوهای گوشتی پس از ۹۰ ساعت محرومیت از آب مشاهده نکردند. آرفوسو و همکاران (Arfuso *et al.*, 2022) نشان دادند که تعداد گلبول‌های سفید خونی، درصد هماتوکریت و هموگلوبین، MCV و باتوجه به گذرا بودن تغییرات هماتولوژیکی ناشی از تنش، ممکن است نمونه گیری‌های دیر هنگام باعث محو شدن تغییرات نسبت به مقادیر پایه گردد (Arfuso *et al.*, 2022). علاوه‌بر آن، درصورت بروز دهیدراتاسیون در حیوان، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین افزایش می‌یابد. بنابراین، تغییرات هماتولوژیکی در مطالعات مختلف به نوع تنش، تفاوت‌های ژنتیکی و شرایط آب و هوایی در حین آزمایش نیز مرتبط است. افزایش مشاهده شده در گلوکز پلاسما ناشی از افزایش ترشح کاته‌کولامین‌ها و کورتیزول پس از لاپاراسکوپی است که منجر به تحریک گلوکونئوژنز و افزایش گلوکز خون می‌گردد (Arfuso *et al.*, 2022).

اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی خون ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی در جدول ۴ نشان داده شده است. در پاسخ به تنش‌های حاد، واسطه‌های پیش التهابی باعث تحریک پاسخ فاز حاد شده و کبد را وادار به تولید پروتئین‌های فاز حاد می‌کند و غلظت پروتئین‌های پلاسما را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این پژوهش، غلظت آلبومین، گلوبولین و پروتئین کل تحت تأثیر جراحی لاپاراسکوپی قرار نگرفت (جدول ۴).

همسو با این پژوهش، در مطالعه‌ای در بره‌های مقید شده و محروم از آب و خوراک، غلظت سرمی کورتیزول نسبت به بره‌هایی که تحت تنش نبودند افزایش یافت اما، غلظت سرمی آلبومین و پروتئین کل تحت تأثیر قرار نگرفت (Apple *et al.*, 1993). مغایر با نتایج این پژوهش، تنش ناشی از حمل و نقل جاده‌ای در اسب‌ها باعث افزایش غلظت پروتئین کل گردید (Arfuso *et al.*, 2023). همچنین آرفوسو و همکاران (Arfuso *et al.*, 2022) نشان دادند که پس از پشم چینی در گوسفند غلظت آلبومین خون کاهش و غلظت گلوبولین‌های آلفا و بتا-۲ افزایش می‌یابد. همچنین دامیان و آنگرفلد (Damián and Ungerfeld, 2011) نشان دادند که ۳۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تنش الکترواجاکولاتور در قوچ، غلظت پروتئین کل پلاسما افزایش می‌یابد، امّا تغییری در غلظت آلبومین رخ نمی‌دهد. تأثیر عوامل تنش‌زا بر غلظت پلاسمایی پروتئین را نمی‌توان به همه نوع عوامل تنش‌زا تعمیم داد و ممکن است توسط نوع عامل تنش زا و سایر شرایط محیطی تحت تأثیر قرار گیرد. افزایش سرعت انجام تلقیح لاپاراسکوپی توسط تکنسین حرفه‌ای و با تجربه باعث کاهش طول مدت تلقیح شده و ممکن است تغییر برخی فراسنجه‌ها مانند پروتئین‌های پلاسما نسبت به غلظت پایه آن‌ها از نظر آماری معنی‌دار نشود. در این پژوهش، افزایش مشاهده شده در غلظت پروتئین‌های پلاسما ممکن است به‌علت محتوای آسیدآمینه‌ای مکمل مولتی آمینوجکت و تأثیر ویتامین‌ها بر سیستم ایمنی بدن باشد. همسو با این پژوهش، هامان و ابوزینا (Hamam and Abou-Zeina, 2007) نشان دادند که استفاده از ویتامین E در گوسفند باعث افزایش سطح گاماگلوبولین‌ها و تقویت سیستم ایمنی بدن می‌گردد.

نتایج تأثیر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی‌آمینوجکت بر غلظت پلاسمایی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در جدول ۵ نشان داده شده است. در این پژوهش، اثر متقابل تیمار × زمان گرایش به معنی‌داری داشت (P = ۰/۰۶۶). غلظت آسپارتات آمینوترانسفراز ۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی تفاوت معنی‌داری بین شاهد و تیمار دریافت‌کننده آسپرومازین به‌همراه مولتی‌آمینوجکت نداشت، امّا ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی غلظت آسپارتات آمینوترانسفراز به‌طور معنی‌داری در تیمار دریافت‌کننده آسپرومازین به‌همراه مولتی‌آمینوجکت کمتر از شاهد بود (P< ۰/۰۵). افزایش غلظت آنزیم‌های کراتین کیناز، آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز در پلاسما نشان‌دهنده آسیب‌های قلبی و کبدی است. آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز در عضلات قلبی، کبد و عضلات اسکلتی وجود دارد، امّا این آنزیم به‌طور عمده در عضلات قلبی متمرکز است (Han *et al.*, 1995). در مطالعه‌ای، نشان داده شد که در خوک‌های مینیاتوری چینی تنش منجر به افزایش غلظت پلاسمایی آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز می‌شود که نشان می‌دهد، این آنزیم می‌تواند به‌عنوان شاخص تنش مورد استفاده قرار گیرد (Han *et al.*, 1995). تنش بسته به شدت و نوع آن، باعث آسیب و رهاسازی آنزیم‌های بافتی و

کبدی به داخل خون می‌شود. در پژوهشی، نشان داده شد کـه در اثـر تـنش حمـل و نقـل در خـوک غلظـت پلاسـمایی آنـزیم آسـپارتات آمینوترانسفراز و کـراتین کینـاز افـزایش مـی‌یابـد، امّـا آلانـین آمینـو ترانسفراز تغییری نمی‌کند (Yu *et al.*, 2007).

جدول ٤- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین بر تغییرات فراسنجه‌های بیوشیمیایی پلاسما در گوسفندان نژاد افشار[۱]

Table 4- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multi Aminoject) on alterations of biochemical parameters in Afshar ewes[1].

تیمارها Treatment	گلوکز Glucose (mg/dl)	پروتئین کل Total protein (g/dl)	آلبومین Albumin (g/dl)	گلوبولین Globulin (g/dl)	آسپارتات آمینوترانسفراز (U/L)[2] AST
شاهد Control	87.16	8.05[b]	1.66[b]	6.42[b]	89.32
آسپرومازین و مولتی آمینوجکت ACM[3]	91.29	9.25[a]	1.87[a]	7.38[a]	74.43
SEM	6.086	0.248	0.058	0.198	6.261
(زمان) Time					
۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی 20 min before laparoscopy	72.89	8.59	1.73	6.86	81.38
۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی 40 min after laparoscopy	106.85	8.80	1.80	7.01	82.37
SEM	4.483	0.261	0.054	0.208	7.222
P-value					
Treat	0.6239	0.0005	0.0053	0.0005	0.1422
Time	0.0001	0.5971	0.4170	0.5971	0.9231
Treat× TIME	0.2621	0.5170	0.2971	0.5170	0.0660

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

۲-AST: فعالیت آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز (بر حسب واحد در لیتر)،

۳-ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).

2-AST: aspartate aminotransferase activity (unit/ litter)

3-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject

جدول ۵- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر پیش تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین بر غلظت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (AST) قبل و پس از لاپاراسکوپی[۱].

Table 5- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multi Aminoject) on plasma aspartateaminotransferase activity before and after LAI in Afshar ewes[1].

تیمارها Treatments	۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی 20 min before laparoscopy	۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی 20 min after laparoscopy
شاهد Control	79.40	99.25[a]
آسپرومازین و مولتی آمینوجکت ACM[2]	83.37	65.50[b]
SEM	10.21	7.452
P- value	0.8009	0.0096

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

۲-ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).

2-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject

در برههای مقید شده و محروم از آب و خوراک غلظت آسپارتات آمینوترانسفراز ۳۰-۲۰ برابر افزایش یافت (Apple *et al*., 1993) علاوه‌براین، فراسنجه‌های کبدی و کلیوی ممکن است در پاسخ به تزریق انواع مختلف آرام‌بخش‌ها تغییر کنند. نشان داده شده است که تغییر در غلظت آنزیم‌های AST و ALT پلاسما می‌تواند ناشی از اثرات سمی آرام‌بخش بر سلول‌های کبدی و یا تحت تأثیر قرار گرفتن فشار خون کبدی باشد (Dujovne and Zimmerman, 1969) در آزمایشی، غلظت AST پلاسمای خرگوش‌های دریافت‌کننده کتامین-زایلازین، ۱۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق افزایش یافت (Gil *et al*., 2002). اثرات محافظتی مکمل‌های ویتامینی و آمینواسیدی در جلوگیری از آسیب‌های کبدی در مطالعات پیشین گزارش شده است (Raza *et al*., 2021). در این پژوهش، کاهش غلظت AST ۴۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی در تیمار دریافت‌کننده آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت ممکن است به اثرات محافظتی ترکیبات ویتامینی و آمینواسیدی موجود در مکمل مولتی‌آمینوجکت مربوط باشد.

توان آنتی‌اکسیدانی و غلظت مالون دی‌آلدهید پلاسما

نتایج مربوط به اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر توان آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما و غلظت مالون دی آلدهید در زمان‌های خارج‌سازی اسفنج، ۲۰ دقیقه قبل و ۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی و همچنین سه روز پس از آن در جدول ۶ نشان داده شده است. سه روز بعد از لاپاراسکوپی غلظت مالون دی‌آلدهید پلاسما افزایش و توان آنتی‌اکسیدانی کل در هر دو تیمار کاهش یافت (۰/۰۵>P). تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت توان آنتی‌اکسیدانی کل پلاسما و غلظت مالون دی آلدهید را تحت تأثیر قرار نداد و همچنین اثر متقابل تیمار × در زمان نیز معنی‌دار نبود. جراحی لاپاراسکوپی از طریق تحریک واکنش‌های التهابی و آندوکرینی، منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود که به نوبه خود ممکن است باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، ایجاد التهاب و چسبندگی پریتونیوم گردد (Laher, 2014).

همسو با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، Önder و همکاران (Önder *et al*., 2023) نشان دادند که در گوسفند در برنامه‌های تلقیح مصنوعی و انتقال جنین از طریق سرویکس، تلاش برای عبور دادن ابزارهای کمک تولیدمثلی از دهانه رحم باعث افزایش غلظت کورتیزول خون و کاهش توان آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. همچنین، برخی از مطالعات انسانی نشان داده‌اند که جراحی لاپاراسکوپی باعث افزایش رادیکال‌های آزاد و مواد واکنش‌دهنده با تیوباربیتوریک اسید (TBARS) می‌شود (Laher, 2014). رهیافت استفاده از انواع مختلف آنتی‌اکسیدان‌ها قبل از جراحی لاپاراسکوپی برای جلوگیری از بروز تنش اکسیداتیو در برخی مطالعات پیشنهاد شده است (Yiannakopoulou *et al*., 2013). در مطالعه‌ای، استفاده از مکمل‌های حاوی انواع ویتامین‌ها و مواد معدنی مؤثر بر سیستم آنتی اکسیدانی، یک هفته قبل و یک هفته بعد از جراحی لاپاراسکوپی باعث بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی پس از جراحی در بیماران شد و سطح TBARS پلاسما به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (Laher, 2014). علت عدم مشاهده اثر معنی‌دار بر فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی در این پژوهش ممکن است نوع مکمل حاوی آنتی‌اکسیدان و زمان استفاده از آن قبل و بعد از جراحی باشد.

نرخ آبستنی

نتایج مربوط به اثر تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت بر نرخ آبستنی در ۴۵ روزگی در جدول ۷ نشان داده شده است. میزان آبستنی در ۴۵ روزگی بین تیمارها تفاوتی نداشت و تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تغییری در نرخ آبستنی ایجاد نکرد. هنگام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی معمولاً استفاده از دو دسته دارو برای تسکین‌بخشی توصیه شده است. دسته اول آلفا-۲ آگونیست‌ها (مانند زایلازین، ۰/۰۵ تا ۰/۱ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) و دسته دوم آرام‌بخش‌ها (مانند آسپرومازین، ۰/۰۵ تا ۰/۱ میلی گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن) پیشنهاد شده است (Sathe, 2018). استفاده از برخی از آرام‌بخش‌ها و آگونیست‌های آلفا-۲ ممکن است از نظر فیزیولوژیک در برخی از فرایندهای تولیدمثلی مداخله نماید (Sciorsci *et al*., 2018GibbsIII and Troedsson, 1995; . نشان داده شده است که تزریق زایلازین در اسب‌هایی که دچار آتونی (atony) عضلانی رحم بودند، باعث افزایش انقباضات تانیک میومتریوم می‌گردد، امّا تزریق آسپرومازین تأثیری بر انقباضات رحمی ندارد (De Lille *et al*., 2000). در مورد تأثیر تزریق انواع مختلف آرام‌بخش‌ها هنگام تلقیح مصنوعی بر نرخ آبستنی و باروری، مستندات علمی کافی وجود ندارد. با این وجود، باتوجه به اینکه انقباضات رحمی در زمان نزدیک به لقاح نقش مهمی در انتقال تخمک و اسپرم به محل لقاح دارند، ممکن است نوع آرام‌بخش در زمان تلقیح، نرخ لقاح و آبستنی را تحت تأثیر قرار دهد. نتایج نرخ آبستنی در پژوهش حاضر نشان داد که تزریق آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت تأثیر منفی بر نرخ آبستنی ندارد که این نتیجه احتمالاً ناشی از عدم تداخل و یا تداخل جزئی آسپرومازین با انقباضات رحمی در حوالی تخمک‌ریزی و لقاح است.

جدول ٦- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر پیش تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین (مولتی آمینوجکت) بر توان آنتی‌اکسیدانی کل و غلظت مالون دی آلدهید پلاسما قبل و بعد از لاپاراسکوپی در گوسفندان نژاد افشار[۱]

Table 6- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids (Multiaminoject) on antioxidant status in before and after AI in Afshar ewes

فراسنجه‌ها Parameters	توان آنتی‌اکسیدانی کل (بر حسب میکرومولار در میلی‌لیتر) Total antioxidant capacity (µmol/ml)	مالون دی آلدهید (بر حسب میکرومولار در میلی‌لیتر) Malondialdehyde (µmol/ml)
تیمارها Treatments		
شاهد Control	241.43	1.41
آسپرومازین و آمینوجکت ACM[2]	253.15	1.35
SEM	8.025	0.062
(زمان)Time		
زمان خارج سازی اسفنج Day of sponge withdrawal	228.49[b]	1.29[b]
۲۰ دقیقه قبل از لاپاراسکوپی 20 min before laparoscopy	272.85[a]	1.26[b]
۴۰ دقیقه بعد از لاپاراسکوپی 40 min after laparoscopy	256.61[ab]	1.38[ab]
۳ روز بعد از لاپاراسکوپی 3 days after laparoscopy	233.02[b]	1.64[a]
SEM[۳]	10.95	0.085
P-value		
Treat	0.3064	0.4921
Time	0.0265	0.0016
Treat × time	0.9553	0.2122

۱-حروف غیر مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار را بین تیمارها نشان می‌دهد (P< ۰/۰۵).

۲-ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت.

۳- SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها است.

1-Different letters in each column indicate significant difference between groups (P<0.05).

2-ACM: Acepromazine combined with Multi-Aminoject.

3- SEM: standard error of means.

جدول ۷- تنش ناشی از تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی (LAI) و اثر پیش تیمار آسپرومازین به‌همراه یک مکمل حاوی اسیدهای آمینه و ویتامین بر نرخ آبستنی[۱]

Table 7- Laparoscopic AI associated stress and the pretreatment effect of Acepromazine combined with multivitamin and amino acids complex (Multi Aminoject) on pregnancy rate

مورد Item	Control شاهد	ACM[1] آسپرومازین و مولتی آمینوجکت	*P-value*
تعداد میش‌های تلقیح شده Number of inseminated ewes	20	20	-
تعداد میش‌های آبستن در سونوی ۴۵ روزگی Number of pregnant ewes on d-45	9	10	-
درصد آبستنی در ۴۵ روزگی Percentage of pregnancy on d-45	45.00	50.00	0.7515

۱- ACM: آسپرومازین به‌همراه مولتی آمینوجکت

1-ACM: Acepromazine combined with Multi Aminoject.

نتیجه‌گیری کلی

عملیات تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی باعث القاء تنش به گوسفندان شد، به‌طوری‌که ۲۰ دقیقه پس از لاپاراسکوپی غلظت کورتیزول به‌طور معنی‌داری نسبت به غلظت پایه افزایش یافت. متعاقب پاسخ کورتیزول، برخی از فراسنجه‌های خونی تحت تأثیر قرار گرفت. به‌طوری‌که پس از لاپاراسکوپی تعداد گلبول‌های سفید خونی و غلظت مالون دی‌آلدهید پلاسما افزایش و در هماتوکریت، هموگلوبین و توان آنتی‌اکسیدانی کل کاهش یافت، امّا غلظت پروتئین‌های پلاسما تحت تأثیر قرار نگرفت. تزریق مولتی آمینوجکت و آسپرومازین باعث افزایش پروتئین‌های پلاسما و کاهش سطح آنزیم آسپارتات آمینوتراسفراز گردید، امّا میزان آبستنی در ۴۵ روزگی را تحت تأثیر قرار نداد. به‌طور کلی، هنگام تلقیح مصنوعی به‌روش لاپاراسکوپی نیازی به استفاده از آرام‌بخش به‌همراه مولتی آمینوجکت نیست و استفاده از آن ممکن است باعث افزایش هزینه‌های تلقیح و تحمیل استرس اضافی به حیوان گردد و به‌جای آن افزایش سرعت هر تلقیح با بهره‌گیری از تکنسین با تجربه پیشنهاد می‌شود.

References

1. Aghamiri, S. M., Samimi, A. S., Hajian, M., Samimi, A. M., & Oroumieh, A. (2022). Effect of xylazine, detomidine, medetomidine and dexmedetomidine during laparoscopic SCNT embryo transfer on pregnancy rate and some physiological variables in goats. *BMC Veterinary Research*, *18*(1), 98. https://doi.org/10.1186/s12917-022-03194-8
2. Ali, B., Al-Qarawi, A., & Mousa, H. (2006). Stress associated with road transportation in desert sheep and goats, and the effect of pretreatment with xylazine or sodium betaine. *Research in Veterinary Science*, *80*(3), 343-348. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.07.012
3. Ali, B. H., & Al-Qarawi, A. (2002). Evaluation of drugs used in the control of stressful stimuli in domestic animals: A review. *Acta Veterinaria Brno*, *71*(2), 205-216.
4. Apple, J., Minton, J., Parsons, K., & Unruh, J. (1993). Influence of repeated restraint and isolation stress and electrolyte administration on pituitary-adrenal secretions, electrolytes, and other blood constituents of sheep. *Journal of Animal Science*, *71*(1), 71-77. https://doi.org/10.2527/1993.71171x
5. Arfuso, F., Fazio, F., Chikhi, L., Aymond, G., Piccione, G., & Giannetto, C. (2022). Acute stress response of sheep to shearing procedures: Dynamic change of cortisol concentration and protein electrophoretic pattern. *Animals*, *12*(7), 862. https://doi.org/10.3390/ani12070862
6. Arfuso, F., Rizzo, M., Giannetto, C., Giudice, E., Piccione, G., Fazio, F., Cirincione, R., Cassata, G., & Cicero, L. (2023). Inflammatory-like status and acute stress response in horses after road transport. *Scientific Reports*, *13*(1), 9858. https://doi.org/10.1038/s41598-023-37069-1
7. Avila-Jaime, B., Ramos-Zayas, Y., Franco-Molina, M. A., Alvarado-Avila, R., Zamora-Avila, D. E., Fimbres-Durazo, H., Zárate-Ramos, J. J., & Kawas, J. R. (2021). Effects of transportation stress on complete blood count, blood chemistry, and cytokine gene expression in heifers. *Veterinary Sciences*, *8*(10), 231.
8. Ballou, M., Sutherland, M., Brooks, T., Hulbert, L., Davis, B., & Cobb, C. (2013). Administration of anesthetic and analgesic prevent the suppression of many leukocyte responses following surgical castration and physical dehorning. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *151*(3-4), 285-293. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.11.018
9. Brearley, J., Dobson, H., & Jones, R. (1990). Investigations into the effect of two sedatives on the stress response in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *13*(4), 367-377. https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1990.tb00791.x
10. Damián, J., & Ungerfeld, R. (2011). The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical, haematological and behavioural parameters. *Reproduction in Domestic Animals*, *46*(4), 646-650. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01722.x
11. Danyer, E., Bilal, T., Altiner, A., Aytekin, İ., & Atalay, H. (2021). The effect of vitamin E treatment on selected immune and oxidative parameters in Kivircik ewes suffering from transport stress. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *105*, 34-41. https://doi.org/10.1111/jpn.13560
12. De Leon, J. A. D., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (159), e61122. https://doi.org/10.3791/61122
13. De Lille, A., Silvers, M., Cadario, M., Tran, T., Cage, C., & LeBlanc, M. (2000). Interactions of xylazine and acepromazine with oxytocin and the effects of these interactions on intrauterine pressure in normal mares and mares with delayed uterine clearance. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, (56), 373-379.
14. Dujovne, C. A., & Zimmerman, H. J. (1969). Cytotoxicity of phenothiazines on Chang liver cells as measured by enzyme leakage. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *131*(2), 583-587. https://doi.org/10.3181/00379727-131-33931
15. Fierro, S., Olivera-Muzante, J., Gil, J., & Viñoles, C. (2011). Effects of prostaglandin administration on ovarian

follicular dynamics, conception, prolificacy, and fecundity in sheep. *Theriogenology*, *76*(4), 630-639. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.03.016
16. GibbsIII, H. M., & Troedsson, M. H. (1995). Effect of acepromazine, detomidine, and xylazine on myometrial activity in the mare. *Biology of Reproduction*, *52*(monograph_series1), 489-493. https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.489
17. Gil, A. G., Illera, J. C., Silván, G., Lorenzo, P. L., & Illera, M. (2002). Changes in hepatic and renal enzyme concentrations and heart and respiratory rates in new zealand white rabbits after anesthetic treatments. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *41*(6), 30-32.
18. Grandin, T. (2021). How to improve livestock handling and reduce stress. *Improving Animal Welfare: A Practical Approach* (Ed. 3), 84-112.
19. Hamam, A., & Abou-Zeina, H. (2007). Effect of vitamin E and selenium supplements on the antioxidant markers and immune status in sheep. *Journal of Biological Sciences*, *7*(6), 870-878. https://doi.org/10.3923/jbs.2007.870.878
20. Han, B., Gao, D., & Wang, Q. (1995). Study on the mechanism of conirol high temperature transport stress in china experimental miniature pig with supplement compound sodium chlobide power. *Acta Vet Zootech Sinica*, *26*, 261-267.
21. Hoffman, J. R., Ratamess, N. A., Ross, R., Shanklin, M., Kang, J., & Faigenbaum, A. D. (2008). Effect of a pre-exercise energy supplement on the acute hormonal response to resistance exercise. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, *22*(3), 874-882. https://doi.org/10.1519/JSC.0b013e31816d5db6
22. Hsieh, C., & Rajashekaraiah, V. (2021). Ferric reducing ability of plasma: A potential oxidative stress marker in stored plasma. *Acta Haematologica Polonica*, *52*(1), 61-67. https://doi.org/10.5603/AHP.2021.0009
23. Jobgen, W., Meininger, C. J., Jobgen, S. C., Li, P., Lee, M. J., Smith, S. B., Spencer, T. E., Fried, S. K., & Wu, G. (2009). Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *The Journal of nutrition*, *139*(2), 230-237. https://doi.org/10.3945/jn.108.096362
24. Kiyma, Z., Alexander, B., Van Kirk, E., Murdoch, W., Hallford, D., & Moss, G. (2004). Effects of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. *Journal of Animal Science*, *82*(9), 2548-2557. https://doi.org/10.2527/2004.8292548x
25. Laher, I. (2014). Systems biology of free radicals and antioxidants (First Ed.). Springer.
26. Lone, F. (2022). Artificial insemination in sheep-a breakthrough in offing. *Applied Veterinary Research*, *1*(1), e2022001-e2022001. https://doi.org/10.31893/avr.2022001
27. McKnight, J. R., Satterfield, M. C., Jobgen, W. S., Smith, S. B., Spencer, T. E., Meininger, C. J., McNeal, C. J., & Wu, G. (2010). Beneficial effects of L-arginine on reducing obesity: potential mechanisms and important implications for human health. *Amino Acids*, *39*, 349-357. https://doi.org/10.1007/s00726-010-0598-z
28. Nayyar, S., & Jindal, R. (2010). Essentiality of antioxidant vitamins for ruminants in relation to stress and reproduction. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *11*(1), 1-9.
29. Önder, N. T., Batı, Y. U., Gökdemir, T., Kılıç, M. C., Şahin, O., Öğün, M., Akyüz, E., Kuru, M., Kırmızıgül, A. H., & Yıldız, S. (2023). Oxidative response of sheep to transcervical applications. *Reproduction in Domestic Animals*. https://doi.org/10.1111/rda.14361
30. Parker, A., Hamlin, G., Coleman, C., & Fitzpatrick, L. (2004). Excess cortisol interferes with a principal mechanism of resistance to dehydration in Bos indicus steers. *Journal of Animal Science*, *82*(4), 1037-1045. https://doi.org/10.2527/2004.8241037x
31. Priskas, S., Valergakis, G., Tsakmakidis, I., Vouraki, S., Papanikolopoulou, V., Theodoridis, A., & Arsenos, G. (2022). The role of housing conditions on the success of artificial insemination in intensively reared dairy ewes in greece. *Animals*, *12*(19), 2693. https://doi.org/10.3390/ani12192693
32. Raza, S., Tewari, A., Rajak, S., & Sinha, R. A. (2021). Vitamins and non-alcoholic fatty liver disease: A molecular insight. *Liver Research*, *5*(2), 62-71. https://doi.org/10.1016/j.livres.2021.03.004
33. Sathe, S. R. (2018). Laparoscopic Artificial insemination technique in small ruminants—A procedure review. *Frontiers in Veterinary Science*, *5*, 266. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00266
34. Sciorsci, R., Piccinno, M., & Rizzo, A. (2018). Scopolamine butylbromide decreases the xylazine-mediated contractility in bovine pregnant uteri. *Theriogenology*, *108*, 348-353. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.033
35. Small, A., Fisher, A. D., Lee, C., & Colditz, I. (2021). Analgesia for sheep in commercial production: Where to next? *Animals*, *11*(4), 1127. https://doi.org/10.3390/ani11041127
36. Stafford, K., Chambers, J., Sylvester, S., Kenyon, P., Morris, S., Lizarraga, I., & de Nicolo, G. (2006). Stress caused by laparoscopy in sheep and its alleviation. *New Zealand Veterinary Journal*, *54*(3), 109-113. https://doi.org/10.1080/00480169.2006.36621
37. Tsuda, Y., Murakami, R., Yamaguchi, M., & Seki, T. (2020). Acute supplementation with an amino acid mixture suppressed the exercise-induced cortisol response in recreationally active healthy volunteers: A randomized,

double-blinded, placebo-controlled crossover study. *Journal of the International Society of Sports Nutrition, 17*(1), 39. https://doi.org/10.1186/s12970-020-00369-2

38. Yardimci, M., Sahin, E., Cetingul, I., Bayram, I., Aslan, R., & Sengor, E. (2013). Stress responses to comparative handling procedures in sheep. *Animal*, *7*(1), 143-150. https://doi.org/10.1017/S1751731112001449
39. Yiannakopoulou, E. C., Nikiteas, N., Perrea, D., & Tsigris, C. (2013). Effect of laparoscopic surgery on oxidative stress response: Systematic review. *Surgical Laparoscopy Endoscopy and Percutaneous Techniques*, *23*(2), 101-108. https://doi.org/10.1097/SLE.0b013e3182827b33
40. Yu, H., Bao, E. D., Zhao, R. Q., & Lv, Q. X. (2007). Effect of transportation stress on heat shock protein 70 concentration and mRNA expression in heart and kidney tissues and serum enzyme activities and hormone concentrations of pigs. *American Journal of Veterinary Research, 68*(11), 1145-1150. https://doi.org/10.2460/ajvr.68.11.1145